

## ビフィズス菌と大腸菌の分子相互作用

著者	大野 友嗣
出版者	法政大学大学院理工学研究科
雑誌名	法政大学大学院紀要．理工学・工学研究科編
巻	61
ページ	1-2
発行年	2020-03-24
URL	<a href="http://doi.org/10.15002/00022945">http://doi.org/10.15002/00022945</a>

# ビフィズス菌と大腸菌の分子相互作用

## MOLECULAR INTERACTION BETWEEN *BIFIDOBACTERIUM* AND *ESCHERICHIA* VIA CARBOHYDRATES.

大野 友嗣

Tomotsugu OHNO

指導教員 山本 兼由

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

A few hundred trillion bacteria cells live with human. Most of such bacteria live in human gut. Among human gut bacteria, 2 members of the phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* occupy the majority. It is known that bacterial interactions among *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in a gut strongly contribute individual human health. In this study, I showed the novel molecular interaction between *Escherichia* and *Bifidobacterium*, minority bacteria in human gut. First, I identified the transporter genes of *E. coli* induced by the conditioned medium of *B. longum*. Northern blotting and luciferase reporter assays indicated that the *uhpT* and *idnT* promoters were significantly induced by the conditioned medium of *B. longum* but not by the conditioned medium of *E. coli*. The induction of the *uhpT* promoter was also found by the culture supernatant of the other species of *Bifidobacterium*. The recombinant glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Leuconostoc mesenteroides* was over expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. The purified glucose-6-phosphate dehydrogenase suppress the induction of the *uhpT* promoter by the conditioned medium of *B. longum*. These results suggest that the carbohydrates secreted from *Bifidobacterium* species support the glucose-6-phosphate utilization of *E. coli*.

**Key Words :** *Escherichia coli*, *Bifidobacterium longum*, glucose-6-phosphate, microbiome, *uhp*

### 1. 緒言

ヒト腸内には 100 兆個を超える細菌が生息しており、宿主機能と密接な関係にある。これらを門別に分類すると多数派と少数派に分けられる [1]。多数派細菌間には競合的な相互作用があることが知られているが、少数派細菌については詳しくわかっていない。少数派細菌のビフィズス菌はヒトミルクオリゴ糖 (HMO) を分解、資化出来る唯一のヒト腸内細菌である [2]。先行研究において、大腸菌とビフィズス菌を定常期まで共培養した際に、初期細胞数に関わらず同程度まで増殖することが明らかとなった [3]。さらに、ビフィズス菌培養上清によって大腸菌ヘキソース-6-リン酸輸送体 *uhpT* の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった [4]。これまでに、この大腸菌 *uhpT* の発現誘導はビフィズス菌培養上清特異的に起こり、転写制御システム UhpABC が必須であることを明らかにした。そこで本研究ではビフィズス菌と大腸菌の相互作用について炭素源取り込みに注目して研究を行った。

### 2. 実験方法

#### (1) 細菌培養上清の作製

ABCM 培地に細菌終夜培養液を植菌し、嫌気状態、37℃で 15 時間培養した後、遠心分離を行い上清を回収した。

回収した上清の pH を 7.2 に合わせ、フィルター滅菌後、室温にて保存した。大腸菌の培養に用いる際には ABCM 培地と培養上清を 3 : 1 の割合で混合させ使用した。

#### (2) pLUX を用いたプロモーター活性測定

各遺伝子の転写開始点上流約 400 bp から開始コドン直前までをプロモーター領域とし、この領域を pLUX ベクターに挿入したプラスミドを構築した。構築したプラスミドを用いて各遺伝子のプロモーター活性を評価した。

#### (3) RT-qPCR

ビフィズス菌培養上清存在下と非存在下で大腸菌を 2.5 時間培養し、全 RNA を調製した。全 RNA を鋳型に、Primer ScriptTM 1<sup>st</sup> strand cDNA synthesis kit (タカラバイオ株式会社) を用いて cDNA を合成した。この cDNA を鋳型とし、SYBR green と標的遺伝子のプライマーを加えて、7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems 株式会社) に従い、PCR を行った。内在性遺伝子として *rrnH* を用い、1/2<sup>ΔCt</sup> を初期 mRNA 相対量とした。

#### (4) 大腸菌を用いた組換え Zwf の精製

pET28a(+) (Novagen 株式会社) に、PCR で増幅した目的の遺伝子領域をクローニングした。これを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、30℃で OD<sub>600</sub> が 0.5~0.6 になるまで培養した。その後 IPTG を添加し、3 時間培養することで目的

タンパク質を過剰発現させた。過剰発現させた大腸菌を細胞破碎し、遠心分離することで上清を得た。この上清を Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより精製することで、精製タンパク質を得た。

### 3. 結果と考察

#### (1) 大腸菌炭素源輸送体の探索

大腸菌が炭素源として利用できる 72 種の物質について、TransportDB2.0 を用いて輸送体を探索した。その結果、605 の大腸菌輸送体遺伝子のうち、炭素源輸送体は 83 遺伝子で構成される 54 種類存在していることが分かった。

#### (2) ビフィズス菌培養上清により発現誘導される大腸菌炭素源輸送体の探索

大腸菌炭素源輸送体 54 種類について、それぞれ 1 遺伝子ずつを標的として、ビフィズス菌培養上清存在下での mRNA 量の変化を RT-qPCR により調べた。その結果、*uhpT* に加え、マンニトール特異的 PTS 系 *cmtA*、グルコン酸輸送体 *idnT* の mRNA 量が増加することが明らかとなった。これらの結果は Northern blotting においても確認された (図 1B)。この 3 種について、ビフィズス菌培養上清存在下でのプロモーター活性の変化を調べた結果、*idnT*、*uhpT* はビフィズス菌培養上清によってプロモーター活性レベルで遺伝子発現誘導されることが明らかとなった。

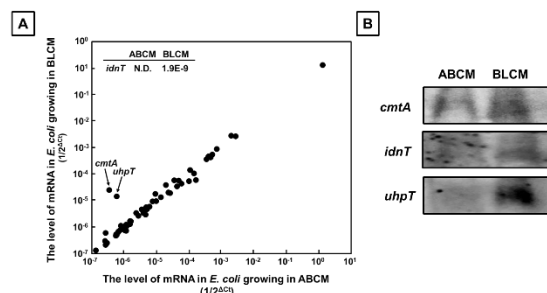


図 1. ビフィズス菌培養上清による大腸菌炭素源輸送体の遺伝子発現誘導

#### (3) ビフィズス菌培養上清に含まれる大腸菌 *uhpT* プロモーター誘導物質の推定

大腸菌 UhpABC のリガンドとしてグルコース-6-リン酸 (G6P) が知られている [5]。そこで、グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) を用いて、ビフィズス菌培養上清に含まれる大腸菌 *uhpT* プロモーター活性誘導物質の推定を行った。*Leuconostoc mesenteroides* の G6PD は遺伝子名 *zwf* として調べられており、D177N 変異を加えることで基質結合能を保ったまま、反応速度が著しく低下することが知られている [6]。この変異 *Zwf* と変異の無い *Zwf* を大腸菌を用いて過剰発現させ、Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。精製 *Zwf* をビフィズス菌培養上清に加え、30 分反応させた後の培養上清を用いて大腸菌 *uhpT* プロモーター活性を調べた。その結果、変異の無い *Zwf* を反応させた培養上清では 1/10 程度にプロ

モーター活性が抑制されたのに対し (図 2A)、D177N 変異 *Zwf* ではほとんど見られなかった (図 2B)。この結果より、ビフィズス菌培養上清に含まれる大腸菌 *uhpT* プロモーター活性誘導物質は G6P 様物質であり、D177N 変異 *Zwf* を用いて単離できる可能性が示唆された。

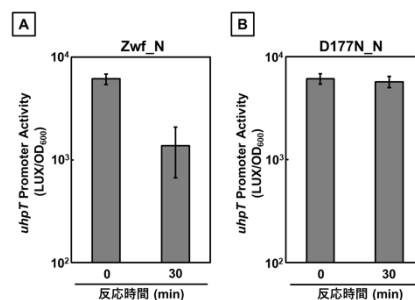


図 2. *Zwf* によるビフィズス菌培養上清依存的な大腸菌 *uhpT* プロモーター活性誘導の不活性化

### 4. 結言

本研究の結果より、以下のモデルを提唱する (図 3)。ビフィズス菌により大腸菌 *uhpT* と *idnT* がそれぞれ独立して誘導されることが明らかとなった。本研究において構築した D177N 変異 *Zwf* を担体として用いることで、ビフィズス菌が分泌する大腸菌 *uhpT* プロモーター活性を誘導する G6P 様化合物について、単離できる可能性が示唆された。

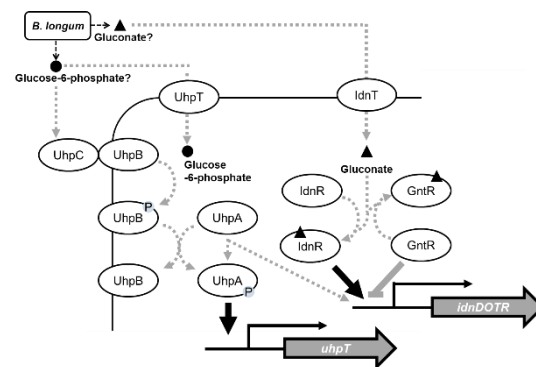


図 3. ビフィズス菌による大腸菌炭素源輸送体発現誘導モデル

**謝辞:** 本研究は山本兼由教授によるご指導のもと、吉村美歩氏、渡邊宏樹氏らのご協力により行われた。ここに深謝の意を表する。

### 参考文献

- David LA. *et al.* (2014) *Nature*. **505**, 556-59.
- Gotoh A. *et al.* (2019) *Microb Biotechnol*. **12**, 259-64.
- Tamura M. (2011) 法政大学修士論文
- Kojima T. (2015) 法政大学修士論文
- Donna MS. *et al.* (1981) *J Bacteriol*. **148**, 203-9.
- Cosgrove MS. (1998) *Biochemistry*. **37**, 2759-67.